

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 1998年10月 2日
Date of Application:

出願番号 平成10年特許願第296138号
Application Number:

[ST. 10/C] : [JP1998-296138]

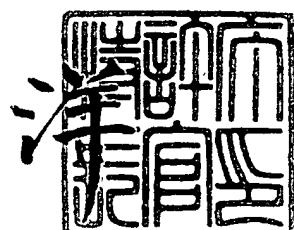
出願人 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2005年 1月 24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川





【書類名】 特許願
【整理番号】 SNMFP98378
【提出日】 平成10年10月 2日
【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿
【国際特許分類】 C12N 5/10
【発明の名称】 樹立細胞
【請求項の数】 5
【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市太白区三神峰1丁目3番地3-501号
【氏名】 細谷 健一
【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市泉区明石南2-1-5
【氏名】 寺崎 哲也
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県川越市今福1672-1-719
【氏名】 上田 正次
【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区八幡5-3-10-402
【氏名】 帯刀 益夫
【特許出願人】
【識別番号】 395007255
【氏名又は名称】 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所
【代理人】
【識別番号】 100090941
【氏名又は名称】 藤野 清也
【電話番号】 3226-6671
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 014834
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【物件名】	受託証	1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 樹立細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞。

【請求項 2】 FERM BP-6507である、請求項 1 記載の樹立細胞。

【請求項 3】 SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られた細胞を継代培養して不死化細胞を得ることを特徴とする、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質を発現する不死化細胞の樹立方法。

【請求項 4】 トランスジェニック動物としてラットを用いる、請求項 3 記載の不死化細胞の樹立方法。

【請求項 5】 SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して得られる、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、網膜毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。

本発明により得られる樹立細胞は、シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給と代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。又、グリア細胞の一種のミューラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞株は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持、網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研

究するのに有用である。

【0002】

【従来の技術】

従来、医薬品の安全性や有効性を精査する試験は、主に動物を用いて行なわれていた。しかし、動物愛護の観点から大量の動物を使用することを避け、培養細胞等を用いて試験管内で医薬品の有効性や安全性を試験する技術の実用レベルでの活用が開始されている。例えば、生体組織から採取した初代細胞や無限増殖する樹立培養細胞を用いる方法で予め試験した後に動物試験を行なうことがなされている。しかし、初代細胞は初期段階ではよく増殖するが、継代とともに次第に増殖が停止し、やがては死滅する（この現象を細胞老化と呼ぶ）。更に、初代細胞の特性は、生体組織から採取する度に異なる危惧に加え、その細胞特性も継代とともに変化することが指摘されている。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合には、試験に供するに足る初代細胞を得ることは非常に難しい。一方、初代細胞の継代を重ねるなかで、細胞老化を免れて無限増殖する能力を獲得した樹立細胞では、安定して均一の特性を持つが、この様な細胞の多くは、その細胞が生体において本来有していた形態や機能の一部或いはその全てを喪失するため、この様な細胞株を用いた場合には、その細胞株の由来する組織での本来の特性を正確に反映することは難しかった。そこで、初代細胞にras やc-mycなどの発癌遺伝子、アデノウイルスの E1A遺伝子、SV40ウイルスのラージT抗原遺伝子、ヒトパピローマウイルスの HPV16遺伝子等を導入して細胞を形質転換し、初代細胞の有する活発な増殖能を継続的に保持し、しかも継代することによってもその細胞固有の特性を喪失しない不死化細胞を樹立する試みがなされている。ところが、この様な不死化細胞においても、対象とする臓器によっては、その初代細胞を調製し、これらの癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入する時点で、すでに幾つかの機能を喪失するため、本来の機能を保持する厳密な意味での不死化細胞の取得は困難であった。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合の初代細胞を調製して株化することは極めて困難であった。

【0003】

これに対し、近年確立された動物個体への遺伝子導入技術を用いて、個々の細

胞に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入するかわりに、これらの遺伝子を安定的に染色体に組み込んだ遺伝子導入動物を作出して、個体の発生時点において既に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を細胞の中に保有する動物の臓器から初代細胞を調製して、これを継代することにより不死化細胞を樹立する方法が報告されている。特に、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは、その臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現は、温度を変えることによって操作することができるため非常に有効である (Noble M. et al. (1995) Transgenic Research 4, 215-225 ; Obinata M. (1997) Genes to Cells 2, 235-244)。マウスに比べ体重が約10倍あるラットは、各種臓器からの細胞株の樹立に供する細胞を調製する上で、特に、網膜毛細血管内皮細胞のような微小器官に由来する細胞を株化する場合には、器官を分離して初代細胞を容易に得ることができため有利である。そこで、各種臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現が温度を変えることによって操作可能である不死化細胞の樹立に有効なSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットを既に作出了した。

【0004】

一方、血液眼関門の研究において、動物愛護の観点から動物試験に替わる網膜毛細血管内皮の初代細胞を用いる方法が試みられるようになってきている。この場合に、試験に供するに足る細胞を小型の実験動物から得ることが難しいため、ウシ等の大型の家畜の眼球を使用しなければならない。例えば、20個のウシの眼球から網膜毛細血管内皮細胞を単離して2回の継代培養を行なっても約 9×10^6 個の細胞しか得られず (Wong H.C. et al. (1987) Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 28, 1767-1775)、医薬品のスクリーニングには大量のウシの眼球が必要であった。このため、これに替わる有効な網膜毛細血管内皮細胞株の提供が切望されていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意研究の結果、不死化遺伝子を導入し

たトランスジェニックラットの網膜組織から網膜毛細血管を分離し、得られた毛細血管から網膜毛細血管内皮細胞を分離することにより、不死化細胞を樹立するに至った。従って本発明は、網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞を得ることを課題とする。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を用いて不死化細胞の樹立方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明は、網膜毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。詳しくは、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞に関する。このような樹立細胞としては、工業技術院生命工学工業技術院研究所、特許微生物寄託センターに受託番号 FERM BP-6507 として寄託された細胞株を挙げることができる。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の網膜組織をホモゲナイズして毛細血管を分離し、得られた網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養することによって不死化細胞を樹立する方法に関する。

さらに、本発明は、このような樹立方法で樹立された細胞に関する。

本発明により得られる樹立細胞は、シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給及び代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。また、グリア細胞の一種のミューラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞株は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持、網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明で使用するSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットは、以下のように得ることができる。即ち、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を、例えば、SV40の複製起点(ori)を欠失させたtsA58ori(-)-2 株の全ゲノムDNAを制限酵素 BamHIで開環して pBR322 に導入したプラスミド pSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991)) を常法に従い大腸菌内で大量に増幅させる。このようにして調製したプラスミドを制限酵素 BamHIで切断してベクター部位を除去する。この様にして得られたtsA58 のラージT抗原遺伝子を持つDNA(5,240bp)には、ラージT抗原遺伝子のプロモーターが内在するため、このDNAを導入したラットにおいては、その全ての体細胞においてこの遺伝子(tsA58のラージT抗原遺伝子)が発現することになる。

【0008】

次に、この様にして得られたDNAを常法に従いラットの全能性細胞に導入して温度感受性ラージT抗原遺伝子を全ての細胞内に有する遺伝子導入ラットを作出する。全能性細胞としては、受精卵や初期胚のほか多分化能を有するES細胞があげられる。この様な卵子や培養細胞へのDNA導入法はマイクロインジェクション法、電気パルス法、リポソーム法、リン酸カルシウム法等が利用できる。

更に、所望する本遺伝子を導入した培養細胞の核を除核未受精卵に移植して初期化すること（核移植）で卵子に本遺伝子を導入することができる。しかし、遺伝子導入ラットを得る効率からは、現在のところ前核期受精卵の雄性前核に本遺伝子をマイクロインジェクションして得られる卵子を仮親の卵管に移植して産仔を得た後、注入遺伝子を持つ産仔を選出し、安定的に本遺伝子が組み込まれた個体を得ることで、個体発生時にすでにtsA58 のラージT抗原遺伝子が各組織の細胞の染色体に組み込まれた遺伝子導入ラットを効率よく作出することができる。

【0009】

次に、この様にして作出した遺伝子導入ラットの各臓器から常法に従い細胞（初代細胞）を取り出して継代培養を繰り返すことで不死化細胞を調製するこ

できる。得られた細胞は33~37℃において永久的増殖能を持ち、39℃においては増殖を停止するため細胞固有の分化形質の発現を制御することができるという特色を持つ。このラットの眼球より網膜を摘出して細切し、テーパー型テフロン製ホモゲナイザーで組織を磨り潰して得られたスラリーを遠心してペレットを得る。得られたペレットを酵素（プロテアーゼ）溶液に懸濁して振とうを加えながら酵素処理を行い、毛細血管を不要な組織から分離させた後、遠心してペレットを得る。得られたペレットから不要な組織を除去するため、25%ウシ血清アルブミンを含むハンクス平衡塩液（HBSS）に懸濁し、遠心により毛細血管ペレットを回収する。得られたペレットを再び酵素溶液に懸濁して酵素処理を行うことで毛細血管を細切した後、培養シャーレーに播種する。2回の継代の後、コロニー形成を行い、増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、この操作を2回繰り返して行うことにより、本発明の細胞を単離することができる。単離された細胞は、tsA58のラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質の発現をウエスタンプロティング法で検定することにより、不死化網膜毛細血管内皮細胞と同定することができる。得られた細胞は、50回の継代の後も33℃において良好な増殖性を示し、網膜毛細血管内皮細胞としての機能を保持した細胞である。

【0010】

【実施例】

以下の実施例をもって本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示したのみであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0011】

【実施例1】

トランスジェニックラットの作出

SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを導入したトランスジェニックラットは、下記の手順で作出了した。

①導入遺伝子の調製

マイクロインジェクションにはSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを使用した。このDNAは tsA58のゲノムDNAを制限酵素 BamHIで開環し、pBR3

22の BamHI部位に導入し、Sfi I 配列をSacII に変換してSV40の複製起点(ori)を欠失する ori(-) としたDNAクローンpSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991) Fig.1参照) から常法に従い調製した。即ち、大腸菌内で増幅させて得たプラスミドDNAのpSVtsA58ori(-)-2を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で消化した後、アガロースゲル電気泳動 (1% gel ; ベーリンガー社製) を行いてベクター部分を分離した5240bpのtsA58 のDNA (直鎖状DNA断片) をゲルから切り出した。アガラーゼ処理 (0.6 unit/100mgゲル : Agarase ; ベーリンガー社製) によりゲルを溶解した後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿処理を行いDNAを回収した。回収した精製DNAをTEバッファー (1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.6) に溶解して 170 μg/mLの精製DNA溶液を得た。このDNA溶液を注入用バッファー (0.1mM EDTAを含む 10mM Tris-HCl, pH 7.6) で 5 μg/mLとなるように希釈して注入用DNA溶液を調製した。尚、調製したDNA溶液は注入操作まで -20℃で保存した。

【0012】

②トランスジェニックラットの作出

ラット前核期受精卵への上記①で調製した注入用DNA溶液のマイクロインジェクションは下記の要領で行った。性成熟した8週齢のウイスター (Wistar) ラットを明暗サイクル12時間 (4:00~16:00 を明時間) 、温度23±2℃、湿度55±5%で飼育し、臍スメアにより雌の性周期を観察して、ホルモン処理日を選択した。先ず、雌ラットに150IU/kgの妊娠馬血清性性腺刺激ホルモン [日本ゼンヤク : PMS全薬 (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)] を腹腔内投与し、その48時間後に75IU/kg のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン [三共臓器 : プベローゲン (human chorionic gonadotropin; hCG)] を投与して過剰排卵処理を行った後、雄との同居により交配を行った。hCG 投与32時間後に卵管灌流により前核期受精卵を採取した。卵管灌流および卵の培養にはmKRB液 (Toyoda Y. and Chang M. C., J. Reprod. Fertil., 36, 9-22 (1974)) を使用した。採取した受精卵を 0.1% ヒアルロニダーゼ (シグマ社製 : Hyaluronidase TypeI-S) を含むmKRB液中で37℃、5分間の酵素処理を行い卵丘細胞を除去した後、mKRB液で3回洗浄して酵素を除去し、DNA注入操作までCO₂-インキュベーター内 (5% CO₂-95% Air, 37

℃, 飽和湿度) に保存した。この様にして準備したラット受精卵の雄性前核にDNA溶液を注入した。注入操作した228個の卵を9匹の仮親に移植して出産させ80匹の産仔を得た。注入DNAのラットへの導入は、離乳直後に断尾して得た尾より調製したDNAをPCR法により検定 [使用プライマー; tsA58-1A, 5'-TCCTA ATGTGCAGTCAGGTG-3' (1365~1384部位に相当), tsA58-1B, 5'-ATGACGAGCTTGCGCA CTTG-3' (1571~1590部位に相当)] した。その結果、遺伝子の導入を認めた20匹 (雄6匹、雌8匹、性別不明6匹) の産仔を得た。これらの中から性成熟期間を経過する12週齢まで生存した11ラインのトランスジェニックラット (雄ライン; #07-2, #07-5, #09-6, #12-3, #19-5, 雌ライン: #09-7, #11-6, #12-5, #12-7, #18-5, #19-8) を得た。これらのG₀世代のトランスジェニックラットとウイスターラットを交配し、雄ファウンダーの2ライン (#07-2, #07-5) と雌ファウンダーの3ライン (#09-7, #11-6, #19-8)において次世代以降への遺伝子の伝達を確認した。

【0013】

【実施例2】

トランスジェニックラットからの網膜毛細血管内皮細胞の分離

網膜からの網膜毛細血管内皮細胞の分離は Greenwoodの方法 (Greenwood J. (1992) J. Neuroimmun., 39, 123-132)を改良して行なった。実施例1で得られたSV40の温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット (1匹) より眼球を摘出した。クリーンベンチ内で氷冷した調製用緩衝液 (10 mM Hepes, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μg/mL streptomycin sulfate, 0.5%ウシ血清アルブミンを含むHBSS) で摘出した眼球をよく洗浄した後、網膜組織を取り取り、組織を1~2 mm³に細切した。細切した組織を1 mL用テーパー型テフロンホモゲナイザー (WHEATON 社製) に移し、1 mLの氷冷した調製用緩衝液を加え、4回のアップダウンのストロークを行い組織をホモゲナイズしてスラリーを得た。得られたスラリーを遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。得られたペレットを1 mLの酵素溶液 (0.01% collagenase/disperse (Boehringer Mannheim社製), 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μg/mL streptomycin sulfate, 20 U/mL deoxyribonuclease I, 0.147 μg/mL

L-tosyl-lysine-chloromethylketone を添加したHBSS) に懸濁し、振とうを加えた水浴中で酵素処理 (37℃, 30分間) を行い、不要な組織から毛細血管を分離した。遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。

【0014】

得られたペレットから不要な組織を除去するため、10mLの25%ウシ血清アルブミンを含むHBSSにペレットを懸濁し、遠心 (1,000g, 15分間, 4℃) により毛細血管画分のペレットを得た。得られたペレットを再び1mLの酵素溶液に懸濁して酵素処理 (37℃, 30分間) を行うことで毛細血管を細切した。遠心 (600g, 5分間, 4℃) してペレットを得た。次に、得られたペレットを2mLの培養液 (15μg/mL endothelial cell growth factor, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μg/mL streptomycin sulfate, 2.50 μg/mL amphotericin Bを添加したDME M) に分散して1枚のcollagen type Iをコートした35mmφ培養シャーレー (Becton Dickinson社製) に種播した。33℃の炭酸ガス培養器 (5% CO₂-95% Air, 飽和湿度) 内で培養 (初代培養) した。培地を1週間に2回交換し、継代はトリプシン液 (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA; Gibco BRL社製) を用いておよそ1週間隔で行った。2回の継代の後、10² ~ 10³ 個の細胞をcollagen type Iをコートした100mmφ培養シャーレー (Becton Dickinson社製) に種播した。33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。培地を1週間に2回交換し、7 ~ 10日後にコロニーを形成した増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリソウカップを用いて周囲の細胞から単離し、得られた細胞を再び100mmφ培養シャーレーに播種して33℃の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。ペニシリソウカップを用いて増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離して5種の細胞株 (TR-iBRB2, TR-iBRB4, TR-iBRB6, TR-iBRB8, TR-iBRB9)を得た。

このTR-iBRB2株を工業技術院生命工学工業技術院研究所、特許微生物寄託センターに寄託した。受託番号は FERM BP-6507 である。

【0015】

【実施例3】

ラージT抗原タンパク質の確認

実施例2で得られた5種の細胞株におけるラージT抗原蛋白質の発現をウエス

タンプロット法（実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ「分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール」 108~115 頁, 羊土社, 1995年発行）により検討した。5種の細胞株（継代数：20）を90mm φ 培養シャーレーで飽和まで培養した。回収した細胞を3% SDS-PBS(pH7.4)で可溶化した後、遠心（10,000 rpm, 10分間）して不溶画分を除去した後、フラッドフォード法（BIORAD社製プロテインアッセイキットIIを使用）で総蛋白質量を定量した。それぞれ20μgの蛋白質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。3%スキムミルク溶液でブロッキングしたニトロセルロース膜に1次抗体として抗SV40ラージT抗原マウス抗体（CALBIOCHEM社製, DP02-C）を、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体（Amersham社製）を反応させ、ラージT抗原蛋白質特異的な反応をアマシャム社製ECLウエスタンプロティング検出システム（RPN2106M1）を用いて検出した。結果を表1に示す。表中+はラージT抗原蛋白質に特異的な反応を検出できたことを示す。この結果、5種の細胞株全てにおいてラージT抗原蛋白質の発現を確認した。

【0016】

【表1】

細胞株	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
T抗原	+	+	+	+	+

【0017】

【実施例4】

細胞株の同定

実施例2で得られた細胞株が網膜毛細血管内皮細胞であることを、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質の発現をウエスタンプロティング法で検定することにより同定した。まず、GLUT-1輸送担体の発現をウエスタンプロティング法で検定した。得られた各細胞株について、実施例3と同じ方法で作製したニトロセルロース膜を用いて、1次抗体として抗GLUT-1マウス抗体（Chemicon社製, Temecular, C

A)又は抗 p-糖蛋白質ウサギ抗体（抗 mdr抗体、Oncogene Research Products社製）を、2次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham社製) 又は HRP 標識抗ウサギ IgE 抗体 (Cappel 社製) を反応させ、GLUT-1蛋白質あるいは p-糖蛋白質特異的な反応をアマシャム社製 ECL ウエスタンプロテイング検出システム (RPN2106M1) を用いて検出した。結果を表2に示す。表中+は、GLUT-1蛋白質又は p-糖蛋白質の発現が確認されたことを示す。この結果、5種の細胞株全てにおいて GLUT-1蛋白質及び p-糖蛋白質の発現が確認された。従って、得られた5種の細胞株が網膜毛細血管内皮細胞であることが同定された。

【0018】

【表2】

細胞株	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
GLUT-1	+	+	+	+	+
P-糖蛋白質	+	+	+	+	+

【0019】

【実施例5】

グルコース輸送能の確認

実施例2で得られた細胞株TR-iBRB2を使用し、3-OMG(3-o-methyl-D-glucose)取り込み能を測定し、濃度依存的なグルコース輸送能を示すことで機能的な GLUT-1輸送担体を有することを確認した。即ち、24穴細胞培養用プレートにTR-iBRB株を 3×10^5 /ウェル/ mLとなるように播き、33°Cの炭酸ガス培養器で24時間培養して細胞をコンフルエントにした。3-OMG の取り込みの測定は次の要領で行なった。先ず、培地を吸引して除去した後、37°Cに温めた 232kBq/mLの[³H]3-OMG を含む uptake bufferを0.2mL 加えた。尚、本実施例において用いたuptake buffer はグルコースを含まないものであり、122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.4mM K₂HP0₄, 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO₃の溶液を5% CO₂-95% O₂ で20分間バブリングして NaOH で pH7.4に調整されたもの（以下 u

ptake buffer①とする)である。10秒後に uptake buffer①を取り除き、4℃の uptake buffer①で洗浄した。以下、 uptake buffer①を取り除くまでの時間を20秒間、30秒間、1分間として同様の操作を行なった。細胞を1%トライトンX-100を含む1mLのPBSで一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定し、3-OMGの取り込み能の直線性を確認した。結果、20秒間の取り込み時間を設定した。

【0020】

次に、3-OMGの取り込みの基質濃度依存性を検討した。細胞を37℃に温めたuptake buffer①で洗浄した後、37℃に温めた462kBq/ウェルの^{[3]H}3-OMGを含むuptake buffer①を0.2mL加えた。ただし、非標識体の3-OMGを0, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 50mM含むuptake buffer①を使用して3-OMGの各濃度液とした。20秒後にuptake buffer①を取り除き、4℃の10mM非標識体3-OMGを含むuptake buffer①で洗浄した。次に、1%トライトンX-100を含む1mLのPBSで一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。結果を図1に示す。尚、3-OMGの濃度に対する取り込み速度のプロット式($V=V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$); V_{max} は最大速度定数、 K_m はミカエリス定数、 $[S]$ は基質濃度)を用いて3-OMGの取り込みの K_m と V_{max} を非線形最少二乗法プログラム(Yamaoka K. et al. (1981)J. Pharmacobio-Dyn., 4, 879-885)を用いて解析した。この結果、GLUT-1の基質である^{[3]H}3-OMGの取り込みは濃度依存的であり、そのミカエリス定数(K_m)は5.6mM、最大取り込み速度定数(V_{max})は45nmol/min/mg proteinであった。従って、本発明の細胞株は、濃度依存的にグルコース輸送能を示すことが確認された。

【0021】

【実施例6】

p-糖蛋白質の輸送能

実施例2で得られた細胞株TR-iBRB2が機能的なp-糖蛋白質輸送担体を持つことをp-糖蛋白質の基質であるcyclosporin A(CyA)の取り込み測定を行い、p-糖蛋白質阻害剤であるverapamil共存下での取り込みと比較することで検定した。24穴細胞培養用プレートに細胞株TR-iBRB2を1X10⁵/ウェル/2mL培地で播種し

、33℃の炭酸ガス培養器内で48時間培養して細胞をコンフルエントにした。CyAの取り込み測定は以下の要領で行なった。先ず、培地を吸引して除去した後に予め37℃に温めたグルコースを含む uptake buffer (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.4 mM K₂HP0₄, 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-glucoseの溶液を5% CO₂-95%O₂で20分間バブリングして、NaOHでpH7.4に調整；以下uptake buffer ②とする)で細胞を洗浄した。次に、37℃に温めた0.25% DMSOを含む uptake buffer②を0.2mL加え30分間プレインキュベーションした後にuptake buffer②を除去し、37℃に温めた37kBq/mLの[³H]CyAと0.075 μMの非標識CyA及び0.25% DMSOを含む uptake buffer②を0.2mL加えた。Verapamil共存下での取り込みは37℃に温めた100 μM verapamil, 0.25% DMSOを含む uptake buffer②を0.2mL加え30分間プレインキュベーションした後にuptake buffer②を除去し、37℃に温めた37kBq/mLの[³H]CyAと0.075 μMの非標識CyA, 100 μM verapamil及び0.25% DMSOを含む uptake bufferを0.2mL加えた。いずれの取り込み反応も30分間行なった。反応液を除去後、4℃のuptake buffer②で3回洗浄した後に1mLの1N-NaOHを加えて一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。その結果p-糖蛋白質の基質である[³H]CyAの細胞／培地の取り込み比は270 μL/mg proteinであるのに対し、p-糖蛋白質の阻害剤である100 μMのVerapamil共存下で[³H]CyAの細胞／培地の取り込み比は490 μL/mgとなり、約1.8倍の有意な取り込みの増加が見られた。また、他の細胞株でも同様の結果が得られた。

【0022】

【実施例7】

スカベンジャー受容体の機能確認

実施例2で得られた細胞株TR-iBRB2が機能的なスカベンジャー受容体を持つことを、蛍光標識体である1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate標識アセチル化LDL (Dil-Ac-LDL, Biomedical Technologies, Stoughton, MA)の取り込みを測定することで解析した。カバーガラスに細胞株TR-iBRB2を1X10⁵/ウエル／mL培地で播種し、33℃の炭酸ガス培養器内で48時間培養して細胞をコンフルエントにした。Dil-Ac-LDLの取り込み測定は以下の

要領で行なった。先ず、培地を吸引して除去した後に予め37℃に温めた uptake buffer②で細胞を洗浄した。次に、37℃に温めた 10 μ g/200 μ L のDil-Ac-LDL を含む uptake buffer②を 0.2 mL 加え30分間炭酸ガス培養器でインキュベーションした。4 時間後に uptake buffer②を除去し、4 ℃の uptake buffer②で3 回洗浄した。次に、3 % formaldehyde/PBS を加え20分間室温に保持して固定したものと共に焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内に取り込まれた蛍光を測定した。その結果、スカベンジャー受容体のリガンドである 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorateで標識されたアセチル化LDL (Dil-Ac-LDL) が細胞内に取り込まれていることを確認した。また、他の細胞株でも同様の結果が得られた。

【0023】

【発明の効果】

本発明により、網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞が提供される。また、SV40温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジエニック動物の網膜組織をホモゲナイズして毛細血管を分離し、得られた網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養することによって不死化細胞の樹立方法が提供される。

本発明により得られる樹立細胞は、シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給と代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。また、グリア細胞の一種のミューラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞株は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持や網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

【図面の簡単な説明】

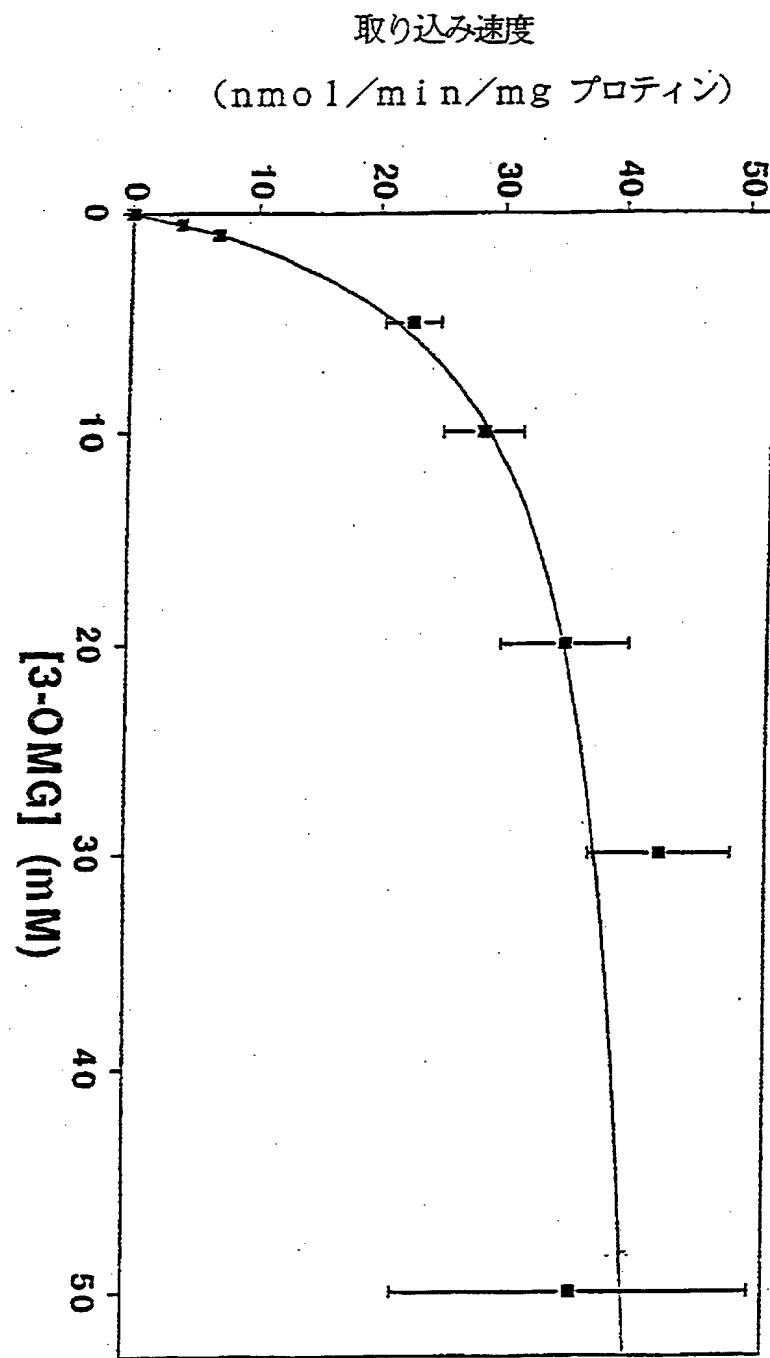
【図1】

実施例5の3-OMG の取り込み速度の基質濃度依存性を示す。

【書類名】

図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 樹立細胞の提供。

【解決手段】 網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞。

SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジェニック動物の網膜組織をホモゲナイズして分離した網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して不死化細胞を樹立する方法。

【効果】 医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持及び網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用。

【選択図】 なし

国際様式 INTERNATIONAL FORM



[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名（名称） 株式会社 ワイエヌニューテクノロジー研究
所 取締役研究所長 上田 正次 殿
寄託者
あて名 〒 329-0512
栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 5
19番地

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) TR-IBRB2	(受託番号) FERM BP- 6507
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成10年9月18日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Natural Resources and Environmental Science and Technology</p> <p>所 長 大 等 信 二 Dr. Shigenobu Ochiai Director-General</p> <p>あて名： 日本国茨城県つくば市東茨城町1番地（郵便番号305-8566） 1-3, Higashimachi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN</p> <p>平成10年（1998） 9月18日</p>	

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 395007255
【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 519 番地
【氏名又は名称】 株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所
【代理人】 申請人
【識別番号】 100090941
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階
藤野特許事務所
【氏名又は名称】 藤野 清也

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 原寄託についての受託証 1

特願平10-296138

出願人履歴情報

識別番号

[395007255]

1. 変更年月日

1995年 3月31日

[変更理由]

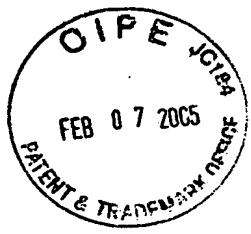
新規登録

住 所

栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林519番地

氏 名

株式会社ワイエスニューテクノロジー研究所



VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Seiya FUJINO, residing at 5-3, Ozuki, Sakae-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 247-0027 Japan, hereby certify that to the best of my knowledge and belief, the attached document is a true translation into English made by me of Japanese Patent Application No. 296138/1998 filed on October 2, 1998.

Seiya Fujino
(Seiya FUJINO)

27 January, 2005
Date

【Document Name】 Patent Application
【File Number】 SNMFP98378
【Filing Date】 2 October, 1998
【Address】 Commissioner of Patent Office
Kenji ISAYAMA Esquire
【International Patent Classification】
C12N 5/10
【Title of the Invention】
Established Cells
【Number of claims】 5
【Inventor】
【Address or Residence】
3-501, 3-banchi, Mitsugamimine 1-chome,
Taihaku-ku, Sendai-shi, Miyagi-ken
【Name】 Kenichi HOSOYA
【Inventor】
【Address or Residence】
2-1-5, Akashiminami, Izumi-ku, Sendai-shi,
Miyagi-ken
【Name】 Tetsuya TERASAKI
【Inventor】
【Address or Residence】
1672-1-719, Imafuku, Kawagoe-shi,
Saitama-ken
【Name】 Masatsugu UEDA
【Inventor】
【Address or Residence】
5-3-10-402, Hachiman, Aoba-ku, Sendai-shi,

Miyagi-ken

【Name】 Masuo OBINATA

【Applicant】

【Code Number】 395007255

【Name】 YS New Technology Institute Inc.

【Attorney】

【Code Number】 100090941

【Name】 Seiya FUJINO

【Telephone】 3226-6671

【Charge】

【Deposit Number】 014834

【Amount of Payment】 ¥21,000

【List of Submission】

【Name of Submission】 Specification 1

【Name of Submission】 Drawing 1

【Name of Submission】 Abstract 1

【Name of Submission】 International Deposit 1

【Document Name】 Specification
【Title of the Invention】 ESTABLISHED CELLS
【Claims】

【Claim 1】 An established cell derived from retinal capillary endothelial cells, which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein.

【Claim 2】 The established cell according to claim 1, having a deposition number of FERM BP-6507.

【Claim 3】 A method of establishing an immortalized cell which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein, the method comprising treating retinal capillary vessels of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced with protease and subculturing the resulting cells to obtain immortalized cells.

【Claim 4】 The immortalized cell according to claim 3, wherein the transgenic animal is a rat.

【Claim 5】 An established cell which expresses a temperature sensitive SV40 large T-antigen gene, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein, the cell obtained by treating retinal capillary vessels of a transgenic animal into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced with protease and subculturing the resulting cells.

【Detailed Description of the Invention】

【0001】

【Technical Field where the Invention Belongs】

The present invention relates to established cells derived from retinal capillary endothelial cells.

The established cells obtained by the present invention form a monolayer of the retinal capillary endothelial cells which have inside-and outside polarity when culturing in a culture dish. Therefore, the established cells are useful for predicting permeation of drugs to the retina by the assessment of chemical uptake into the retinal capillary endothelial cells, studying supply and metabolism of various factors and nutritions in the retinal parenchyma, studying the transport mechanism of permeation of selective materials which are present in retinal capillary endothelial cells, studying toxicity of chemicals on retinal capillary endothelial cells, and so on. In addition, a blood retinal barrier can be reconstructed in the test tube (in vitro) by coculture with Mueller cells which are a kind of glia cells. The cell lines of the present invention are therefore useful for cellular level studies on screening drugs regarding the safety and efficacy thereof, and developing methods for diagnosing and treating diseases relating to intraocular homeostatic maintenance and functional disorders of retinal tissues.

【0002】

【Background Art】

Conventionally, tests for the assessment of safety and efficacy of drugs have mainly been conducted using animals. However, to avoid use of a large number of animals from the viewpoint of animal right, technologies using cultured cells for in-vitro assessment of safety and efficacy of drugs are

used on a practical level. For example, a technique of first testing using primary culture cells collected from living tissues or established culture cells which can infinitely proliferate, and then testing using animals is employed. The primary culture cells can initially proliferate very well, but the proliferation gradually declines as the subculture advances, and finally cells die out. This phenomenon is called cellular senescence. Furthermore, in addition to the fear that the characteristics of primary culture cells may differ each time they are collected from living tissues, the primary culture cells are said to change the characteristics as the subculture advances. Particularly, when the multiplication rate is very slow or when the cells are derived from a small organ, it is very difficult to obtain a sufficient amount of the primary culture cells for test. On the other hand, established culture cell which have acquired the capability of infinitely proliferating during subcultures of the primary culture cells can maintain stable characteristics. However, most of these cells no longer have part or all of the forms and functions possessed by the cells when they were in a living body. Therefore, it is difficult for such established cells to precisely reflect the original characteristics which the cell lines exhibited in the tissues from which they have been derived. In view of this situation, establishment of immortalized cells which can continuously maintain an active proliferation capability possessed by the primary culture cells without losing the characteristics inherently possessed by the cells during subculture, has been tried by transforming

the cells by introducing oncogenes such as ras and c-myc, E1A gene of adenovirus, large T-antigen gene of SV40 virus, HPV16 gene of human papillomavirus, and the like. Such immortalized cells which are derived from some organs already lose several functions at the time of introducing oncogenes or large T-antigen genes after preparation of a primary culture cell. Thus, acquisition of immortalized cells in the stringent meaning of holding an original function has been difficult. Preparing a primary culture cell and acquiring a cell line has been very difficult, particularly when the multiplication rate is very slow or when the cells are derived from a small organ.

【0003】

To overcome these problems, a method of establishing immortalized cells by applying a recently developed transgenic technology to individual animals has been proposed. Instead of introducing oncogenes or large T-antigen genes into individual cells, according to this method, transgenic animals into which these genes have been introduced in chromosomes in a stable manner are prepared. Then, a primary culture cell is prepared from an organ of these animals which possesses the oncogenes or large T-antigen genes in the cells at the time of development of the individuals. The primary culture cells is subcultured to establish immortalized cells. In particular, immortalized cells are easily available from organs of transgenic mice into which a large T-antigen gene of a temperature sensitive mutant tsA58 of SV40 has been introduced. The immortalized cells are very useful because proliferation of the resulting cells and expression of the

differentiation character can be managed by changing the temperature (Noble M. et al. (1995) Transgenic Research 4, 215-225; Obinata M. (1997) Genes to Cells 2, 235-244) . Rats having a body weight about ten times that of mice are advantageous for preparing cells used for the establishment of a cell line from various organs, particularly for preparing a cell line originating from small organs such as retinal capillary endothelial cells, because primary culture cells can be easily obtained by separating organs. Therefore, transgenic rats into which a large T-antigen gene of a temperature sensitive mutant tsA58 of SV40 has been introduced, which are useful for establishing immortalized cells due to easy availability from various organs and the capability of controlling the proliferation of the resulting cells and expression of the differentiation character by changing temperatures, had already been produced.

【0004】

On the other hand, in studies on blood retinal barrier a method of using a primary culture cell of retinal capillary endothelium in place of animal tests is being developed in view of animal right. In this instance, because it is difficult to obtain a sufficient amount of primary culture cells which can be provided for test from small animals, the eyeballs of large animals such as cattle must be used. However, the number of cells obtained by isolating retinal capillary endothelial cells from twenty eyeballs of cattle and subculturing the cells for two generations is at most 9×10^6 or so (Wong H. C. et al. (1987) Invest. Ophthalmol, Visual, Sci.,

28, 1767-1775). Thus, a great number of eyeballs of cattle is required for screening drugs. Therefore, an effective retinal capillary endothelial cell stock which can be used in place of the cells from the eyeballs of cattle has been desired.

【0005】

【Problems to be Solved by the Invention】

In view of this situation, the present inventors have conducted extensive studies and, as a result, have established immortalized cells from transgenic rats into which immortalizing genes have been introduced by separating retinal capillary vessels from the retinal tissue of the rats and isolating retinal capillary endothelial cells from the resulting capillary vessels. An object of the present invention is therefore to obtain established cells derived from retinal capillary endothelial cells and capable of expressing a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transport carrier, and p-glycoprotein.

Another object of the present invention is to provide a method of establishing immortalized cells using a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58.

【0006】

【Means to Solve the Problems】

The present invention relates to the established cells derived from retinal capillary endothelial cells. In particular, the present invention relates to established cells which express a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transport carrier, and p-glycoprotein. Cell deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology,

Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industries, under the deposition number FERM BP-6507 can be given as such established cells.

Furthermore, the present invention relates to a method of establishing immortalized cells comprising homogenizing the retinal tissue of such a transgenic animal into which immortalizing genes have been introduced, separating capillary vessels, treating the resulting retinal capillary vessels with protease, and subculturing the resulting cells.

Furthermore, the present invention relates to the established cell obtained using such a method of establishment.

Such established cells of the present invention form a monolayer of the retinal capillary endothelial cells which have inside-and-outside polarity when culturing in culture dish. Therefore, the established cells are useful for predicting permeation of drugs into the retina by the assessment of drug uptake into the retinal capillary endothelial cells, studying supply and metabolism of various factors and nutritions in the retinal parenchyma, studying the transport mechanism of permeation of selective materials which are present in retinal capillary endothelial cells, studying toxicity of drugs on retinal capillary endothelial cells, and so on. In addition, a blood retinal barrier can be reconstructed in a test tube (in vitro) by coculturing with Mueller cells which are a kind of glia cells. The cell lines of the present invention are therefore useful in screening drugs regarding safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to

intraocular homeostatic maintenance and functional disorders of retinal tissues through cellular level studies.

【0007】

【Embodiments of the Invention】

The transgenic rat using in the present invention into which a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 has been introduced can be obtained as follows. Specifically, a whole genome DNA of tsA58ori(-)-2 which is produced from a large T-antigen gene of a temperature sensitive mutant tsA58 of SV40, for example, with deletion of the SV40 ori (replication origin), is linearized using a restriction endonuclease BamHI, and introduced into pBR322 to obtain a plasmid pSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991)). The plasmid is amplified in Escherichia coli in a large amount according to a conventional method. The plasmid thus obtained is cut with a restriction endonuclease BamHI to eliminate a vector region. Because the DNA (5,240 bp) having a large T-antigen gene of tsA58 thus obtained has a promoter of the large T-antigen gene therein, a rat into which the DNA is introduced expresses this gene (the large T-antigen gene of tsA58) in all somatic cells.

【0008】

Next, the resulting DNA is introduced into totipotent cell s of rats in accordance with a conventional method to prepare transgenic rats having a temperature sensitive large T-antigen gene in all cells. As a totipotent cell, ES cells having totipotency can be given in addition to fertilized ova and early embryos. A microinjection method, electroporation method, liposome metho

d, calcium phosphate method, and the like can be used for introducing DNA into such ova and cultured cells.

Furthermore, the present gene can be introduced into ova by transplanting a nucleus of cultured cells, into which a desired gene of the present invention has been introduced, in enucleation unfertilized ova and initializing the ova (nuclear transplantation). However, as far as the efficiency of obtaining a transgenic rat is concerned, a transgenic rat having a large T-antigen gene of tsA58 incorporated into chromosomes of cells of each tissue at the time of development of individuals can be efficiently obtained by producing ova through microinjection of the gene of the present invention into male pronucleus of the pronucleus fertilized ova, transplanting the ova into the oviduct of an foster mother to obtain offspring, and selecting the offspring having the injected gene, thereby stably obtaining individuals into which the gene of the present invention has been incorporated.

[0009]

Immortalized cells can be prepared by extracting cells (primary cells) from organs of gene-introduced rats thus obtained, and repeating subculture of the cells according to a conventional method. The resulting cells have the capability of permanently proliferating at 33-37°C and terminating the proliferation at 39°C, thus the cells have advantages that can control the expression of the differentiation character originally possessed by the cells. The retina is prepared from the eyeballs of this rat and cut into small pieces. The tissues are homogenized by using a taper-type homogenizer made of Teflon and the resulting slurry was centrifuged to obtain

pellets. The resulting pellets are suspended in an enzyme (protease) solution and treated with the enzyme while shaking, thereby separating capillary vessels from unnecessary tissues. Pellets are obtained by centrifugation. The pellets thus obtained are suspended in a Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 25% bovine serum albumin to remove unnecessary tissues. Capillary vessel pellets are recovered by centrifugation. After the capillary vessels are cut into fine pieces by enzyme treatment of the pellets by suspending again in the enzyme solution, the cells are inoculated in a culture dish. After subculturing two generations, colonies are formed. Colonies exhibiting a comparatively fast growth rate are isolated from surrounding cells using a penicillin cup. This procedure are repeated twice to isolate the cells of the present invention. Expression of a large T-antigen of tsA58, GLUT-1 transporter and p-glycoprotein are confirmed by the Western Blotting method, whereby the isolated cells are identified to be the immortalized retinal capillary endothelial cells. The cells thus obtained exhibit excellent growth after 50 generation subculture at 33°C and possess functions of retinal capillary endothelial cells.

【0010】

【Example】

The present invention will now be described in more detail by way of examples, which are given for the purpose of explanation and should not be construed as limiting the present invention.

【0011】

[Example 1]

Preparation of transgenic rat

A transgenic rat carrying DNA of an SV40 temperature sensitive mutant tsA58 was prepared according to the following method.

① Preparation of a gene to be introduced

DNA of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 was used for microinjection. The genome DNA of tsA58 was linearized using a restriction endonuclease BamHI and introduced into the BamH site of pBR322 to convert the Sfi I sequence to the SacII sequence, thereby obtaining a DNA clone pSVtsA58 ori(-)-2 with deletion of the SV40 ori site (replication origin) (See Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991), Figure 1). The DNA was prepared from the pSVtsA58 ori(-)-2 according to a conventional method. Specifically, the pSVtsA58 ori(-)-2 of plasmid DNA obtained by amplification in *Escherichia coli*. was digested using a restriction endonucleases BamHI (made by Takara Shuzo Co., Ltd.) and DNA (Linear DNA fragment) of tsA58 with a length of 5240 bp separated the vector region by agarose gel electrophoresis (1% gel; Boeringer company) were cut out from the gel. The gel was dissolved by agarase treatment (0.6 unit/100 mg gel: Agarase; made by Boeringer Co.). DNA was recovered by phenol-chloroform treatment and ethanol precipitation treatment. The recovered and purified DNA was dissolved in a TE buffer (10 mM Tris-HCl containing 1 mM EDTA, pH 7.6) to obtain a purified DNA solution with a concentration of 170 μ g/mL. The DNA solution was diluted with a buffer (10 mM Tris-HCl containing 0.1 mM EDTA, pH 7.6) to a

concentration of 5 μ g/mL to prepare a DNA solution for microinjection. The resulting DNA solution was stored at -20°C until use for microinjection.

【0012】

②Preparation of transgenic rat

Preparation of transgenic rat Microinjection of the DNA solution prepared in ① above to the rat fertilized ova at pronucleus stage was carried out according to the following procedures. Sexually mature Wistar rats, aged eight weeks, were kept in a condition of a 12 hour light-and-shade cycle (light hours: 4:00-16:00) at 23±2°C and RH 55±5%. The estrous cycle of female rats was observed by vaginal smear to select the hormonal treating day. A pregnant-mare serum gonadotrophic hormone (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG, manufactured by Nippon Zenyaka Co.) was intraperitoneally administered at a dose of 150 IU/kg to female rats. After 48 hours, 75 IU/kg of human chorionic gonadotrophic hormone (human chorionic gonadotropin; hCG, manufactured by Sankyo Zoki Co.) was administered thereby effecting superovulation treatment. The female and male rats were mated by being together in a cage. The fertilized ova at pronucleous stage were collected by oviduct perfusion at 32 hours after the hCG administration. A mKRB solution (Toyoda Y. and Chang M.C., J. Reprod. Fertil., 36, 9-22 (1974)) was used for the oviduct perfusion and incubation of ova. The collected (fertilized) ova were treated by an enzyme in an mKRB solution containing 0.1% hyaluronidase (Hyaluronidase Type I-S, made by Sigma Co.) at 37°C for 5 minutes to remove cumulus cells. After washing three times

with the mKRB solution to remove the enzyme, the fertilized ova were stored in a CO₂ incubator (5% CO₂-95% air, 37°C, saturated humidity) until DNA microinjection. A DNA solution was microinjected into the male pronucleus of the rat (fertilized) ova thus prepared. 228 ova after microinjection were transplanted in nine recipients (foster mothers) and 80 pups were obtained.

The integration of the microinjected DNA was analyzed with DNA prepared from tails of the rats immediately after weaning by the PCR method (primers used: tsA58-1A, 5'-TCCTAATGTGCAGTCAGGTG-3' (corresponds to 1365-1384 sites), tsA58-1B, 5'-ATGACGAGCTTGGCA CTTG-3' (corresponds to 1571-1590 sites)). As a result, 20 rats (6 male, 8 female, and 6 unknown sexuality) were identified to have the gene introduced. Among these rats, 11 transgenic rat lines (male lines: #07-2, #07-5, #09-6, #12-3, #19-5, female lines: #09-7, #11-6, #12-5, #12-7, #18-5, #19-8) which survived as long as 12 weeks after elapse of the sexual maturation period were obtained. These G₀ generation transgenic rats were mated with Wistar rats and established 2 lines of male founders (#07-2, #07-5) and 3 lines of female founders (#09-7, #11-6, #19-8), by confirming that the genes was transferred to next generation.

【0013】

【Example 2】

Isolation of retinal capillary endothelial cells from transgenic rats

The method of Greenwood (Greenwood J. (1992) J. Neuroimmun., 39, 123-132) was modified and applied to the isolation of retinal capillary endothelial cells from the

retina. Eyeballs were collected from one transgenic rat carrying a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58 described in Example 1. The eyeballs were thoroughly washed with an ice-cooled buffer solution (HBSS containing 10 mM Hepes, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ /mL streptomycin sulfate, 0.5% bovine serum albumin) in a clean bench. The retinal tissue was removed and cut into pieces with a volume of 1-2 mm³. The tissue pieces were placed in a 1 mL taper-type Teflon homogenizer (WHEATON Co.). 1 mL of ice-cooled buffer solution was added and the tissue was homogenized by four up-and-down strokes to obtain a slurry. The resulting slurry was centrifuged (600 g, 5 minutes, 4°C) to obtain pellets. The pellets were suspended in a 1 mL of enzyme solution (HBSS containing 0.01% collagenase/dispase (Boehringer Mannheim) 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ /mL streptomycin sulfate, 20 U/mL deoxyribonuclease I, 0.147 μ /mL tosyl-lysine-chloromethylketone) and digested by enzyme in a water bath with shaking at 37°C for 30 minutes, thereby separating capillary vessels from unnecessary tissues. The enzyme treated slurry was centrifuged (600 g, 5 minutes, 4°C) to obtain pellets.

[0014]

The pellets thus obtained were suspended in HBSS containing 25% bovine serum albumin to remove unnecessary tissues. The pellets of capillary vessel fraction were obtained by centrifugation (1,000 g, 15 minutes, 4°C). The pellets were suspended again in a 1 mL enzyme solution and treated at 37°C for 30 minutes to digest the capillary vessels

into fine pieces. The enzyme treated slurry was centrifuged (600 g, 5 minutes, 4°C) to obtain pellets. Next, the pellets obtained were dispersed in a 2 mL culture solution (DMEM containing 15 µg/mL endothelial cell growth factor, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 2.50 µg/mL amphotericin B) and inoculated in a 35 mmØ culture dish coated with collagen type I (a product of Becton Dickinson Co.). The cells were incubated (primary culture) at 33°C in a CO₂ incubator (5% CO₂-95% air, saturated humidity). Subculture was carried out at an interval of about one week using a trypsin solution (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA; manufactured by Gibco BRL) while replacing the medium twice a week. After subculturing twice, 10²-10³ cells were inoculated in a 100 mmØ culture dish coated with collagen type I (a product of Becton Dickinson Co.). The cells were incubated at 33°C in a CO₂ incubator to form colonies. After preparation of colonies for 7-10 days while replacing the medium twice a week, the colonies exhibiting a comparatively fast growth rate were isolated from the surrounding cells using a penicillin cup. The cells obtained were again inoculated in a 100 mmØ culture dish and incubated at 33°C in a CO₂ incubator to form colonies. Colonies exhibiting a comparatively fast growth rate were isolated using a penicillin cup to obtain five lines of cells (TR-iBRB2, TR-iBRB4, TR-iBRB6, TR-iBRB8, TR-iBRB9).

TR-iBRB2 was deposited in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, the Ministry of International Trade and Industries. The deposition number is FERM BP-6507.

【0015】

【Example 3】

Confirmation of large T-antigen proteins

Expression of large T-antigen proteins in the five cell lines obtained in Example 2 was examined by the Western Blotting method (Experimental Medicine Separate Volume, Biotechnology Manual UP Series, "Cancer research protocol by the molecular biological approach", pages 108-115, YODOSHA Publishing Co., 1995). The five cell lines (the 20th generation) were cultured in 90 mmØ culture dishes until saturation. The collected cells were solubilized using 3% SDS-PBS (pH 7.4) and unsolubilized fractions were removed by centrifugation (10,000 rpm, 10 minutes), and then the total amount of proteins was determined by the Bradford method (using the protein assay kit II of the BIO-RAD Co.). The proteins were separated by the SDS polyacrylamide gel electrophoresis in the amount of 20 µg each and transferred onto nitrocellulose membranes. The nitrocellulose membranes blocked by a 3% skimmed milk solution were reacted with an anti-SV40 large T-antigen mouse antibody (DP02-C, CALBIOCHEM Co.), as a primary antibody, and a HRP labeled anti-mouse IgG antibody (Amersham Co.), as a secondary antibody, to detect the reactions specific to large T-antigen proteins by using the ECL Western Blotting detection system (RPN2106M1) made by Amersham Co.. The results are shown in Table 1. In the Table, "+" indicates that the reaction specific to a large T-antigen protein was detected. As a result, the expression of large T-antigen proteins was confirmed in all five cell lines.

【0016】

【Table 1】

Cells	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
T-Antigen	+	+	+	+	+

【0017】

【Example 4】

Identification of cell lines

The cell lines obtained in Example 2 were identified to be retinal capillary endothelial cells by confirming the expression of a GLUT1 transporter and p-glycoprotein by the Western Blotting method. Using nitrocellulose membranes prepared in the same manner as in Example 3, the cells obtained were reacted with an anti-GLUT-1 mouse antibody (Temecular, CA, Chemicon Co.) or an anti-p-glycoprotein rabbit antibody (anti-mdr antibody, Oncogene Research Products Co.), as primary antibodies, and a HRP labeled anti-mouse IgG antibody (Amersham Co.) or a HRP labeled anti-rabbit IgE antibody (Cappel Co.), as secondary antibodies, to detect the reactions specific to GLUT-1 protein or p-glycoprotein using the ECL Western Blotting detection system (RPN2106M1) made by Amersham Co.. The results are shown in Table 2. The results are shown in Table 2. In the Table, "+" means that the GLUT-1 protein or p-glycoprotein were detected. As a result the GLUT-1 protein and p-glycoprotein were detected in all five cell lines. Therefore, the five cell lines obtained were detected to be retinal capillary endothelial cells.

【0018】

【Table 2】

Cells	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
T-Antigen	+	+	+	+	+
P-Glycoprotein	+	+	+	+	+

【0019】

【Example 5】

Confirmation of glucose transport capability

Using the cells TR-iBRB2 obtained in Example 2, The 3-OMG (3-o-methyl-D-glucose) uptake capability was determined to confirm that the cells have a functional GLUT-1 transporter from exhibiting concentration-dependent glucose transport capability. Specifically, TR-iBRB cells were inoculated in a 24-well cell culture plate at a concentration of 3×10^5 cells /well/mL and incubated for 24 hours at 33°C in a CO₂ incubator to make the cells confluent. The 3-OMG uptake was determined according to the following procedure. After removing medium by aspiration, 0.2 mL of an uptake buffer containing 232 kBq/mL of [³H]3-OMG heated to 37°C was added. The uptake buffer used in this Example did not contain glucose and was prepared from a solution which contains 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.4 mM MgSO₄ · 7H₂O, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM Hepes, and 25 mM NaHCO₃ by bubbling 5% CO₂-95% O₂ into the solution for 20 minutes and adjusting the pH of the resulting solution to 7.4 with NaOH (this is hereinafter designated as uptake buffer ①). After 10 seconds, the uptake buffer ① was removed and the residue was washed with the uptake buffer ① having 4°C of temperature. The

same procedure was then repeated except for changing the period of time removing the uptake buffer ① to 20 seconds, 30 seconds, or one minutes. The cells were solubilized overnight in 1 mL of PBS containing 1% Triton X-100 and the radioactivity was measured using a liquid scintillation counter to confirm the linearity of the 3-OMG uptake capability. As a result, an uptake time of 20 seconds was set.

【0020】

Next, the substrate concentration dependency of the 3-OMG uptake capability was examined. After washing the cells with the uptake buffer ① heated to 37°C, 0.2 mL of the uptake buffer ① containing 462 kBq/well of [³H]3-OMG heated to 37°C was added.

Solutions containing 3-OMG at different concentrations were prepared by using the uptake buffer ① containing non-labeled 3-OMG at a concentrations of 0, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, and 50 mM. After 20 seconds, the uptake buffer ① was removed and the residue was washed with the uptake buffer ① containing 10 mM non-labeled 3-OMG at 4°C. Next, the cells were solubilized overnight in 1 mL of PBS containing 1% Triton X-100 and the radioactivity was measured using a liquid scintillation counter. The results are shown in Figure 1. Using the plot formula for the uptake rate vs. the 3-OMG concentration ($V = V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$), wherein V_{max} indicates a maximum velocity constant, K_m indicates the Michaelis constant, and $[s]$ is a substrate concentration), the K_m and the V_{max} for 3-OMG uptake were analyzed using the non-linear minimum square program (Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobio-Dyn., 4, 879-

885). As a result, it was confirmed that the uptake of [³H]3-OMG which is the substrate of the GLUT-1 was concentration-dependent, the Michaelis constant (K_m) was 5.6 mM, and the maximum velocity constant (V_{max}) was 45 nmol/min/mg protein. Accordingly, the cell lines of the present invention were confirmed to exhibit a concentration-dependent glucose transport capability.

【0021】

【Example 6】

Transport capability of p-glycoprotein

Possession of a functional p-glycoprotein transport capability by cells TR-iBRB2 obtained in Example 2 was examined by measuring the uptake of cyclosporin A (CyA) which is the substrate of the p-glycoprotein and comparing the results with the uptake capability under the presence of verapamil which is a p-glycoprotein inhibitor. Specifically, cell lines TR-iBRB were inoculated in a 24-well cell culture plate at a concentration of 1×10^5 /well/mL culture medium and incubated at 33°C in a CO₂ incubator to make the cells confluent. The CyA uptake was determined according to the following procedure. After removing the medium by aspiration, the cells were washed with an uptake buffer previously heated to 37°C containing glucose (which was prepared from a solution which contains 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.4 mM Mg SO₄ · 7H₂O, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO₃, and 10 mM D-glucose by bubbling 5% CO₂-95% O₂ into the solution for 20 minutes and adjusting the pH of the resulting solution to 7.4 with NaOH; this is hereinafter designated as uptake buffer ②). After the addition of 0.2 mL of uptake buffer ② heated to 37°C containing 0.

25% DMSO, the cells were preincubated for 30 minutes. Then, the uptake buffer ② was removed and 0.2 mL of uptake buffer ② containing 37 kBq/mL of [³H]CyA, 0.075 μ M of non-labeled CyA, and 0.25% DMSO, heated to 37°C, was added. For uptake in the presence of verapamil, 0.2 mL of uptake buffer ② containing 100 μ M of verapamil and 0.25% DMSO heated to 37°C was added, and the cells were preincubated for 30 minutes, followed by the removal of the uptake buffer ② and the addition of 0.2 mL of uptake buffer, heated to 37°C, containing 37 kBq/mL [³H]CyA, 0.075 μ M non-labeled CyA, 100 μ M verapamil, and 0.25% DMSO. Both uptake reactions were carried out for 30 minutes. After removing the reaction solution, the residue was washed with uptake buffer ② of 4°C three times, and then cells were solubilized overnight with the addition of 1 mL of 1N NaOH. Then, the radioactivity was determined using a liquid scintillation counter. As a result, a significant increase in the uptake amount of about 1.8 times was confirmed. Specifically, the cell/medium uptake ratio of [³H]CyA which is the substrate of the p-glycoprotein was 270 μ L/mg protein, whereas the cell/medium uptake ratio of [³H]CyA in the presence of 100 μ M verapamil which is an inhibitor of the p-glycoprotein was 490 μ L/mg protein. The same results were obtained with other cell lines.

【0022】

【Example 7】

Confirmation of function of scavenger receptor

Possession of a functional scavenger receptor in cells of TR-iBRB2 obtained in Example 2 was examined by measuring

uptake of an acetylated LDL (Dil-Ac-LDL, Biomedical Technologies, Stoughton, MA) labeled with a fluorescence labeling material, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate. Specifically, TR-iBRB2 cells were inoculated on a cover glass at a concentration of 1×10^5 /well/mL medium and incubated at 33°C in a CO₂ incubator for 48 hours to make the cells confluent. The Dil-Ac-LDL uptake was determined according to the following procedure. After removing the medium by aspiration, the cells were washed with the uptake buffer ② previously heated to 37°C. Next, 0.2 mL of the uptake buffer ② containing 10 µg/200 µL Dil-Ac-LDL which was heated to 37°C was added, followed by incubation in a CO₂ incubator for 30 minutes. After 4 hours, the uptake buffer ② was removed and the residue was washed with the uptake buffer ② of 4°C. After the addition of 3% formaldehyde/PBS and immobilization by keeping at room temperature for 20 minutes, fluorescence uptaken into cells were measured by using a confocal laser scanning microscopy. As a result, uptake of an acetylated LDL (Dil-Ac-LDL) labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate, which is a scavenger receptor ligand, into the cells was confirmed. The same results were obtained with other cells.

【0023】

【Effects of the Invention】

The present invention provides established cells originating from retinal capillary endothelial cells, which express a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein. Furthermore, a method of

establishing immortalized cells can be provided, which comprises homogenizing the retinal tissue of a transgenic animal carrying a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58, separating capillary vessels, treating the resulting retinal capillary vessels with protease, and subculturing the resulting cells.

Such established cells obtained by the present invention form a monolayer of the retinal capillary endothelial cells which have inside-and-outside polarity when culturing in culture dish. Therefore, the established cells are useful for predicting permeation of drugs into the retina by the assessment of drug uptake into the retinal capillary endothelial cells, studying supply and metabolism of various factors and nutritions in the retinal parenchyma, studying the transport mechanism of permeation of selective materials which are present in retinal capillary endothelial cells, studying toxicology of drugs on retinal capillary endothelial cells, and so on. In addition, a blood retinal barrier can be reconstructed in a test tube (in vitro) by coculture with Mueller cells which are a kind of glia cells. The cell strains of the present invention are therefore useful in screening drugs regarding safety and efficacy thereof, and developing a method for diagnosing and treating diseases relating to the maintenance of intraocular homeostasis and functional disorders of retinal tissues on the cellular level studies.

[Brief Description of the Drawings]

[figure 1]

Figure 1 shows a substrate concentration dependency of a 3-OMG uptake speed in Example 5.

【Document Name】 Abstract

【Abstract】

【Problems】 To provide established cells.

【Means to be solved】

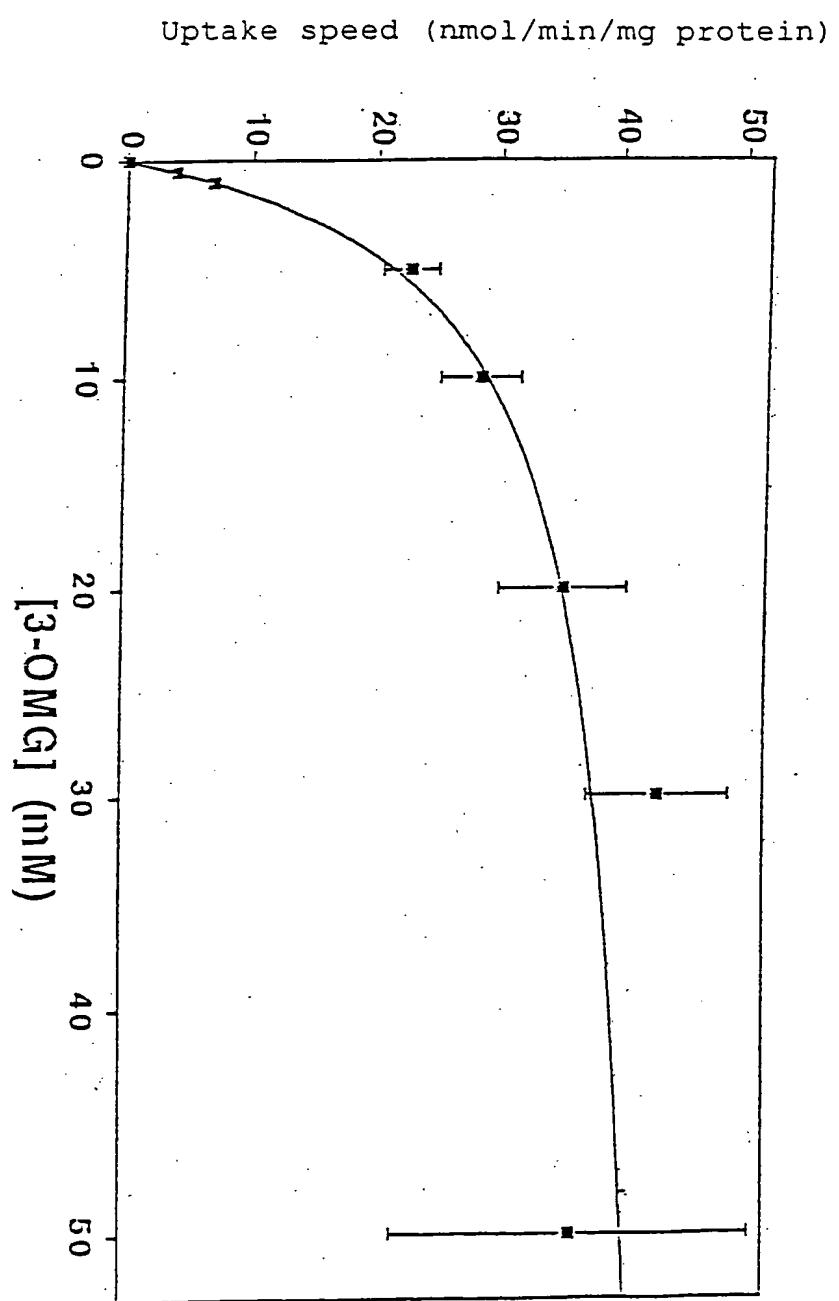
Established cells originating from retinal capillary endothelial cells, which express a temperature sensitive SV40 large T-antigen, GLUT-1 transporter, and p-glycoprotein.

A method of establishing immortalized cells can be provided, which comprises homogenizing the retinal tissue of a transgenic animal carrying a large T-antigen gene of SV40 temperature sensitive mutant tsA58, separating capillary vessels, treating the resulting retinal capillary vessels with protease, and subculturing the resulting cells.

【Effect】 These cells are useful in screening drugs regarding safety and efficacy thereof, and developing method for diagnosing and treating diseases relating to nutrition metabolism in retinal tissues and brain on cellular level studies.

【Drawing】 Non

[Figure 1]



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

氏名（名称） 株式会社 ウィエヌヌーテクノロジー研究
所 取締役研究所長 上田 正次

寄託者 殿
あて名 〒 329-0512
栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 5
19番地

1. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）
TR-iB RB2

（受託番号）
FERM BP- 6507

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

□ 科学的性質
■ 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成10年9月18日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agen~~ス~~ri~~ス~~rial Science and Technology

所 長 大曾 信一~~ス~~ 氏~~ス~~ Director-General

Dr. Shin-ichi Ochiai Director-General

あて名： 日本国茨城県つくば市東大和田1丁目1番地（郵便番号305-8566）

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken

305-8566, JAPAN

平成10年(1998) 9月18日